

WEITERE ENZYMHISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN PHYSIOLOGISCHER
FUNKTIONSPHASEN DER MAMMA

JOHANNES LEUN

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552619_0056

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Mainz

Direktor: Prof. em. Dr. H. Bredt

und

Aus dem Pathologischen Institut des Städt. Krankenhauses Fulda

Direktor: Prof. Dr. R. Bässler

Weitere enzymhistochemische Untersuchungen
physiologischer Funktionsphasen der Mamma

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz den Medizinischen
Fachbereichen

vorgelegt von

Johannes Leun

aus Gießen / Hessen

Mainz 1974

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. Wolf

Referent: Prof. Dr. R. Bässler

Korreferent: Prof. A. Schäfer



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I Einleitung	1
II Untersuchungsgut	3
III Histochemische Methoden	4
1. Alkalische Phosphatase	4
2. Alkalische Phosphatase	4
3. Saure Phosphatase	5
4. Unspezifische Esterase	6
5. Glukose-6-Phosphatase	6
6. Adenosintriphosphatase	7
7. Succino-Dehydrogenase	7
8. Monoamino-Dehydrogenase	8
9. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	9
10. Laktat-Dehydrogenase	9
11. Leuzinaminopeptidase	10
12. Dehydrogenasen	11
a. Glutamat-Dehydrogenase	11
b. Malat-Dehydrogenase	11
c. Glycerophosphat-Dehydrogenase	11
d. Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase	11
e. Isozitronensäure-Dehydrogenase	11
13. Galaktosidase	12
14. Bewertungsmaßstab der Enzymaktivität	12
IV Ergebnisse der histotopochemischen Enzymuntersuchungen	14
V Beurteilung der Ergebnisse	25
VI Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33
Lebenslauf	36

I Einleitung

Die Milchdrüse bei Menschen und Säugetieren ist bis heute in ihren verschiedenen Entwicklungsphasen sowohl morphologisch als auch biochemisch in vielfältiger Form untersucht worden. Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes wurden in letzter Zeit die Veränderungen in der Feinstruktur und im Stoffwechsel der Mamma während der einzelnen Aktivitätsphasen aufgeklärt. So war es möglich, genaueren Einblick in die Sekretbildung, den zellulären Wandel der Epithelstrukturen, die Lokalisation von Hormonwirkungen und speziellen Stoffwechselprodukten zu bekommen.

Die Änderung der Aktivität der Mamma während der Schwangerschaft wird durch Sexualhormone gelenkt. Die Entwicklung der Milchgänge und des Drüsenparenchyms der Mamma wird durch den Anstieg von Östrogen und Progesteron hervorgerufen. Östrogen blockiert gleichzeitig die Bildung des luteotropen Hormons (LTH) und damit die Milchbildung. Gleich zu Beginn der Schwangerschaft steigt der Nukleinsäuregehalt der Mamma sowie der Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel steil an. Durch den bei der Geburt abfallenden Östrogenspiegel kommt es zur LTH-Ausschüttung und dadurch zur Milchbildung. Jetzt beginnt eine Änderung und Steigerung aller Stoffwechselvorgänge. Die Kohlenhydrate werden nicht mehr über den Embden-Meyerhof-Weg abgebaut, sondern laufen jetzt über den oxydativen Pento- seabbauweg, was durch einen fast auf das Hundertfache erhöhten Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Spiegel angezeigt ist (GLOCK und McLEAN, 1954; ABRAHAM, HIRSCH und CHAIKOFF, 1954; RAPOPORT, 1964; MUNFORD, 1964). Fettsäure- und Eiweißsynthese werden in gleichem Maße aktiviert. Gleichzeitig ist eine allgemeine Aktivitätsvermehrung zahlreicher Enzyme zu beobachten. Nach Beendigung der Laktation finden wir Rückbildungserscheinungen, die mit gleicher Intensität und Geschwindigkeit verlaufen.

Zell- und Drüsenstrukturen werden abgebaut, die Stoffwechselaktivitäten bilden sich zurück. Ziel der Untersuchungen ist es, begonnene Studien zur Histotopochemie der Mamma fortzusetzen und mit histochemischen Methoden Untersuchungen mit einem erweiterten Enzymmuster in den einzelnen Funktionsphasen der Mamma durchzuführen. Ferner soll die Enzymtopik aufgezeichnet und versucht werden, quantitative Aussagen mit dieser Methodik zu machen.

II Untersuchungsgut

In den Versuchen wurden 25 weibliche Albinoratten eines Spragne Dawley-Stammes einer Mainzer Tierzuchtanstalt verwendet. Allen Tieren wurde unter Äthernarkose Mammasgewebe operativ entnommen. Die Tiere wurden in vier Gruppen unterteilt:

1. Gruppe: 8 juvenile Tiere mit einem Körpergewicht zwischen 145 und 180 gr.
2. Gruppe: 6 gravide Tiere mit einem Körpergewicht von 300-420 gr.
3. Gruppe: 5 laktierende Tiere mit einem Körpergewicht von 190-290 gr.
4. Gruppe: 6 Tiere im Stadium physiologischer Involution mit einem Körpergewicht von 210-290 gr.

III Histochemische Methoden

1. Alkalische Phosphatase

Metallsalz-Methode nach Gomori (Pearse, 1961)

Fixation: 16-20µ dicke Kryostatschnitte werden bei 4° C eine Stunde in 4 % Formalin fixiert, danach mit Wasser gespült.

Inkubation: 90 Minuten bei 37° C.

Inkubationslösung:

Na-Glycerophosphat	2 %		10	ml
Calciumchlorid	2 %		25	ml
Magnesiumchlorid	1 %		0,5	ml
0,1 m Barbituratpuffer	pH 9,3	..	7,5	ml
Aqua dest			7	ml
	pH 9,3		50	ml

Nachbehandlung:

Schnitte 3-5 Minuten in 2 % Cobalt-Nitrat inkubieren, danach spülen mit Wasser. Danach Schnitte 1-2 Minuten in 1 % Ammonsulfid. Spülen. Danach steigende Alkoholreihe. Eindecken in Eukitt.

2. Alkalische Phosphatase

Azofarbstoffmethode nach Goessner (1959)

Fixation: 6-20µ dicke Kryostatschnitte in 4 % neutralem Formalin 30 Minuten bei 5° C fixieren.

Inkubation: Bei 37° C 12 Stunden

Inkubationslösung:

0,1 m Na-Veronal-Puffer ...	pH 9,3		25	ml
Emulphore o Lsg.*			5	ml
Echtblausalz B			50	mg
Natrium-a-Naphthylphosphat			25	mg
	pH 9,3		30	ml

* Emulphore E.O. Typ 1178c BASF = Diazopon, Dispersierungsmittel

pH-Kontrolle ohne Substrat, auf pH 9,3 regulieren.

Lösung gut mischen, danach abfiltrieren.

Nachbehandlung:

10 Minuten in Wasser spülen, danach mit Kayzers Gelatine eindecken.

3. Saure Phosphatase

Methode nach Gomori (Pearse, 1961)

Fixation: 30µ dicke Kryostatschnitte 30 Minuten in 4 %
neutralem Formalin bei 4° C fixieren, danach
spülen in Wasser.

Inkubation: 12 Stunden bei 37° C

Inkubationslösung:

0,05 m Acetatpuffer	pH 5,3	50	ml
3 % Na-Glycerophosphat		150	mg
Bleiacetat		0,8	gr

pH 5,3	50	ml
--------	----	----

danach filtrieren.

Nachbehandlung:

1. Abspülen mit Aquadest.

2. 2 % Essigsäure 1 Minute

3. Abspülen mit H₂O

4. 1 % Ammonsulfid 2 Minuten, danach mit Wasser spülen

5. Alkoholreihe 10 Minuten und eindecken in Eukitt.

4. Unspezifische Esterase (Gomori 1952)

1. 30µ dicke Schnitte im Kryostaten

2. Inkubation: 90 Minuten bei 20° C.

3. Inkubationslösung:

1 % Lösung von α-Naphthylacetat in	
100 % Aceton = 10 mg ad 1 ml Aceton ...	1 ml
0,1 m Acetatpuffer pH 6,8	... 49 ml
Echtblausalz B	... 50 mg
pH 6,8	50 ml

Fixation: Erfolgt vor Inkubation in 4 % Formalin
30 Minuten bei 4° C.

Nachbehandlung:

15 Minuten spülen unter dem Wasserhahn, danach eindecken
in Kaysers Gelatine.

5. Glukose-6-Phosphatase

Schwermetall-Simultan-Methode nach von Deimling (1964)

Fixation: 30µ dicke Kryostatschnitte in 6 % Glutardial-
dehyd bei 5° C, kurz in Aqudest abspülen.

Inkubation: 3 Stunden bei 37° C.

Inkubationslösung:

0,1 m Bleiacetat		3 ml
0,2 m Triäthanolamin		20 ml
0,1 m Magnesiumchlorid		1 ml
Acetatpuffer pH 5		5 ml
1 % Tiron		6 ml
Dinatrium-Glukose-6-Phosphat		125 mg
Aquadest.		15 ml

pH 7,0 einstellen 50 ml

pH-Kontrolle vor Zugabe des Substrates

Nachbehandlung:

Abspülen in Aqua dest. Danach inkubieren in 1 % Ammonium-sulfid 1-2 Minuten, abspülen, danach Alkoholreihe und eindecken mit Eukitt.

6. Adenosintriphosphatase pH 7,2

Schwermetallsimultanmethode nach von Deimling (1964)

Fixation: 10-20 μ dicke Kryostatschnitte 60 Minuten in 6 % Glutardialdehyd bei 5° C fixieren, danach kurz in Aqua dest. abspülen.

Inkubation: 60 Minuten bei 37° C.

Inkubationslösung:

0,1 m Bleiacetat		3 ml
3 m Natriumacetat		5 ml
0,1 m Magnesiumchlorid		1 ml
1 % Tiron		5 ml

Bevor Natriumacetat zugegeben wird, pH-Kontrolle einstellen auf 7,2. Wenn pH zu niedrig, nochmals bis zu 10 ml 3 m Natriumacetat zugeben und pH einstellen.

Dinatrium-Adenosin- triphosphat		60 mg
Aqua dest.		ad. 50 ml

pH 7,2	50 ml
--------	-------

7. Succino-Dehydrogenase

Methode nach Nachlas, M.M., Tsou, K.C., de Souza, E., Cheng, C.S. and Seligman, A.M. 1957

Keine Fixierung

16 μ dicke Kryostatschnitte

Inkubation: 2 Stunden bei 37° C in einer feuchten Kammer.

Inkubationslösung:

0,2 m Na-Succinat	 0,54 gr ad	10 ml
0,2 m Phosphatpuffer	 pH 7,6	10 ml
Nitro Blue Tetrazolium	 10 mg ad	100 ml Wasser
Ca-Chlorid 0,03 m		0,2 ml
Al-Chlorid 0,01 m		0,8 ml
NaHCO ₃ 0,6 m		2,0 ml
pH 7,6		33,0 ml

Filtrieren und auf 37° C bringen.

Die Inkubationslösung mehrmals tropfenweise auf die Schnitte geben. Während der Inkubation sind die Schnitte stets horizontal zu lagern. Danach waschen in Aqua dest.

Fixierung: 24 Stunden in 4 % Formalin. Anschließend in 15 % Alkohol 5 Minuten spülen und mit Kaysers Gelatine eindecken.

8. Monoamino-Dehydrogenase (Pearse 1961)

Keine Fixation, 16µ dicke Kryostatschnitte.

Inkubation: 2 bis 3 Stunden. Inkubation bei 37° C, in einer feuchten Kammer.

Inkubationslösung

Tryptaminhydrochlorid		75 mg
Na-Sulfat	120 mg ad 50 ml H ₂ O	5 ml
Nitro Blue Tetrazolium		15 ml
0,1 m Phosphatpuffer	pH 7,6	15 ml
Aqua dest.		30 ml
pH 7,6		65 ml

Die Inkubationslösung mehrmals tropfenweise auf die Schnitte geben. Während der Inkubation sind die Schnitte stets horizontal zu lagern.

Nachbehandlung:

2 Minuten waschen in fließendem Wasser.

Fixation: 24 Stunden bei 40° C in 4 % neutralem Formalin, danach waschen und eindecken mit Kayzers Gelatine.

9. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Methode nach Rudolph und Klein (1964)

Keine Fixierung

16µ dicke Kryostatschnitte

Inkubation: 45 Minuten bei 37° C in einer feuchten Kammer

Inkubationslösung:

Di-Natrium-Glukose-6-Phosphat	10 mg
TPN (Natriumsalz)	12,5 mg
0,2 m Tris-Puffer pH 7,2	10 ml
1 % Nitro Blue Tetrazolium 50 mg ad 5 ml H ₂ O ...	5 ml
Aqua dest.	10 ml
pH 7,2	25 ml

Filtrieren und auf 37° C bringen.

Inkubationslösung tropfenweise auf die Schnitte geben.

Während der Inkubation Schnitte horizontal lagern.

Fixierung: 24 Stunden in 4 % neutralem Formalin, danach waschen und eindecken mit Kayzers Gelatine.

10. Lactatdehydrogenasen

Methode nach Nachlas, M.M., Tsou, K.C., de Souza, E., Cheng, C.S. and Seligman, A.M. 1957

1. 16µ dicke Kryostatschnitte

2. Inkubation: Die Lösung wird auf die Schnitte getropft, welche horizontal in einer feuchten Kammer zu lagern sind. Dauer: 90 Minuten bei 37° C.

3. Inkubationslösung:

DPN ... 25 mg/5 ml H ₂ O	1,5 ml
Nitro BT ... 25 mg/5 ml H ₂ O	1,5 ml
Phosphatpuffer pH 7,4	0,5 ml
0,5 m Natriumlaktat	3,0 ml
Aqua bidest.	4,0 ml
pH 7,4	15,0 ml

Vor der Fixierung 1 Minute in 1 % HCL inkubieren.

4. Fixierung: 24 Stunden in 4 % Formol

5. Nachbehandlung: Eindecken in Gelatine.

11. Leuzinaminopeptidase

(nach Nachlas, M.M., Tsou, K.C., de Souza, E., Cheng, C.S. and Seligman, A.M., 1957)

1. 16u dicke Kryostatschnitte

2. Inkubation: 90 Minuten bei 37° C. Lösung auf Schnitte tropfen, Präparate in feuchter Kammer halten.

3. Inkubationslösung:

8 mg Leucin-b-naphthylamid HCL	1,0 ml
Acetatpuffer pH 6,5	10,0 ml
0,85 % NaCL	8,0 ml
0,2 m KCN	1 ml
Echtblausalz B	10,0 mg
pH 6,5	20,0 ml

4. Nachbehandlung:

- 2 Minuten mit physiolog. Kochsalzlösung spülen
- 2 Minuten in 0,1 m Kupfersulfatlösung
- 1 Minute mit physiolog. Kochsalzlösung spülen
- Eindecken mit Kaysers Gelatine.

12. Dehydrogenasen (Pearse 1961)

1. 16u dicke Kryostatschnitte
2. Inkubationslösung, bestehend aus

a) Stammlösung

b) Substratlösung

ad a) Stammlösung

Nitro-BT ... 1 mg/ml	25,0 ml
Tris-Puffer	pH 7,4 25,0 ml
0,1 m Na-Xyanid	 10,0 ml
Aqua dest.	30,0 ml

pH 7,4 90,0 ml

Stammlösung bei 4° C lagern. Zu der jeweiligen

Stammlösung werden 20 mg DPN in die Inkubationslösung hinzugegeben.

ad b) Substratlösung für

12a. Glutamat-Dehydrogenase	Lsg 1, 1 molar .. 1 ml
12b. Malat-Dehydrogenase	Lsg 2, 1 molar .. 1 ml
12c. Glycerophosphat-Dehydrogenase	Lsg 3, 1 molar .. 1 ml
12d. Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase	Lsg 4, 1 molar .. 1 ml
12e. Isozitronensäure-Dehydrogenase	Lsg 5, 1 molar .. 1 ml

Lsg 1: Mono-natriumsalz der L-Glutaminsäure

Lsg 2: L-Äpfelsäure

Lsg 3: DL -Glycerinphosphorsäure • Na₂-salz

Lsg 4: DL-β-Hydroxybuttersäure (Na-salz)

Lsg 5: DL-Isocitronensäure • Na₃-salz • H₂O

Inkubationslösung:

Stammlösung 9 ml

Substratlösung 1 ml

pH 7,4 10,0 ml

30 Minuten bei 37° C inkubieren.

3. Nachbehandlung:

Spülen in Wasser, dann 10 Minuten in 10 % Formalin fixieren, danach mit Kayzers Gelatine eindecken

13. β -Galaktosidase (Pearse 1961)

1. 16 μ dicke Kryostatschnitte

2. Inkubation: 12 Stunden bei 37° C inkubieren

Inkubationslösung: folgende Lösung ist 6 Monate bei 4° C haltbar:

100 mg 6-Brom-2-Naphthyl- β -D-Galaktopyranosid in 15 ml Methanol lösen. Dann 200 ml 70° C warmes H₂O hinzu. Abkühlen lassen. 85 ml Phosphat Citrat-Puffer (pH 4,95) hinzu geben. 100 ml H₂O hinzugeben.

a. Schnitte bei 37° 12 Stunden in dieser Lösung inkubieren.

b. In drei Küvetten jeweils 3 Minuten mit Aqua dest. spülen.

c. 30 Minuten in eine Fast Blue B-Lösung (1 mg/1 ml) von pH 7,4 (mit Tris-Puffer) bei 4° C.

d. 3 mal in kaltem H₂O spülen

e. Mit 10 % Formalin bei 20° C mindestens eine halbe Stunde fixieren

f. Kayzers Gelatine

14. Bewertungsmaßstab der Enzymaktivität

Durch die Möglichkeit, Enzyme in Form ihrer Reaktionsprodukte mit Hilfe spezieller Anfärbemethoden sichtbar zu machen, kann man ihre Lokalisation bestimmen. Weiterhin lassen sich durch die Farbintensität Aussagen bezüglich ihrer Quantität machen, da ein direkter Zusammenhang zwischen der Intensität der "Enzymfärbung" und der vorliegenden Enzymkonzentration - sprich Enzymaktivität - besteht. Je intensiver die Anfärbbarkeit der Reaktions-

produkten ist, desto höher ist die Enzymaktivität (EA). Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden - modifiziert nach ZIMMERMANN (1959) - die verschieden starken Enzymaktivitäten je nach Farbintensität in 6 Stufen eingeteilt:

- 0 = keine nachweisbare Färbung
- 1 = nicht eindeutig spezifische Färbung
- 2 = gerade angedeutete spezifische Färbung
- 3 = schwach, aber deutlich positive Färbung
- 4 = deutlich positive Färbung
- 5 = stark positive Färbung
- 6 = sehr stark positive Färbung

Aus dem Vergleich der Farbreaktionen ergeben sich die hier angewendeten Intensitätsstufen, die lediglich als relatives und grobes Maß für metabolische Prozesse und den Drüsenepithelien zu verstehen sind.

IV Ergebnisse der histotopochemischen Enzymuntersuchungen

1. Alkalische Phosphatase (APH)

Zwei Methoden wurden angewandt, die Azofarbstoff- und die Metallsalzmethode. Hierbei gab es prinzipiell dieselben Ergebnisse, nur zeigten sich Unterschiede im Hinblick auf die Begrenzungsschärfe der Fällungsreaktion. Die Azomethode liefert stärkere Farbtintensität, hierbei fällt besonders die starke, spezifisch auf die Myoepithelzellen gerichtete Lokalisation auf, während sich bei der Schwermetallsalzmethode mehr eine Anfärbung der Basis der Epithelzellen der Drüsenalveolen zeigte. Die APH-Enzymaktivität ist danach in der basalen und interzellulären Zellmembran lokalisiert. Geringe Enzymaktivität läßt sich auch im Kapillarendothel feststellen. Keine Reaktion in BG-Zellen und Nerven. Die APH ist schon bei dem juvenilen Tier deutlich nachweisbar und zeigt während der Gravidität und zu Beginn der Laktation einen steilen, fast gleichförmigen Anstieg. Während der frühen Gravidität war der Anstieg etwas geringer, während das Maß des Anstiegs im letzten Laktationsabschnitt gering war oder negativ wurde.

Die lichtoptisch nachgewiesene Lokalisation der APH wurde elektronenoptisch überprüft und ergab einen selektiven Niederschlag entlang der gesamten Basalmembran sowie an Myoepithelzellen und Interzellularspalten (BÄSSLER und BRETHFELD, 1968).

2. Saure Phosphatase (SPH)

Die SPH konnte intensiv in den Korbzellen, außerdem - aber schwächer - in den Kapillarendothelzellen festgestellt werden. Bindegewebe, Fettzellen und Epithel zeigten keine Aktivitäten. Die Enzymaktivität nimmt während Gravidität und Laktation allmählich zu, erreicht während

der Laktation ein Maximum, fällt dann wieder ab, um noch einmal ein zweites Maximum während der Involution zu erreichen.

3. Unspezifische Esterasen (UE)

Hier finden wir eine starke Enzymaktivität um Fettzellen und in den Endstücken der Epithelien, während Myoepithelien und Bindegewebe keine Niederschläge zeigen. Media und Intima der Gefäße bringen starke Anfärbungen.

4. Glukose-6-Phosphatase (G-6-P)

Dieses Ferment läßt sich deutlich an der Basis der Epithelzellen und im Bereich der Myoepithelzellen (MEZ) lokalisieren. In der Adventitia der Gefäße bandförmige Anfärbungen. Fettzellen zeigen keine Reaktion. Das Enzym ist schon bei juvenilen Tieren deutlich nachweisbar, erreicht während der Gravidität ein höheres Niveau, welches auch in der Laktationszeit nicht mehr ansteigt, um dann in der Involutionsphase langsam abzufallen (Abb. 1 u. 2).

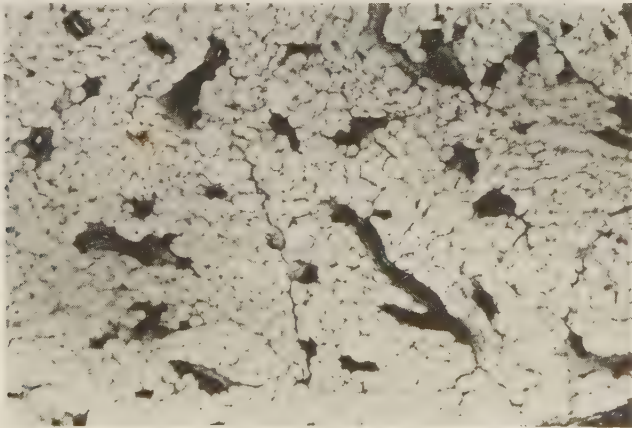


Abb. 1: Mamma einer juvenilen Ratte. Positive Glukose-6-Phosphatase-Reaktion im Drüsenepithel. Vergr. 90 x

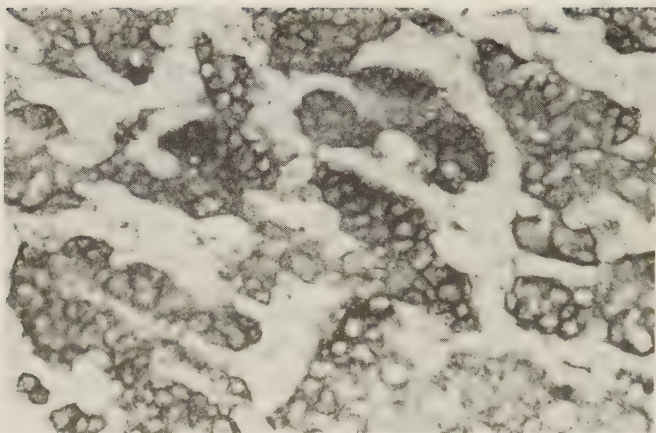


Abb. 2: Mamma während der Gravidität. Stark positive Reaktion der Glukose-6-Phosphatase in der Epithelbasis. Freibleiben des Fettgewebes. Vergr. 90 x

5. Adenosintriphosphatase (ATP)

Arterien, Venen und Nerven zeigen deutliche Enzymaktivität (EA). Bei den Arterien ist die Intima und Adventitia bandförmig, bei den Venen die Muskularis herdförmig angefärbt. Lymphknotenkapseln und Endothelzellen der Intermediärsinus lassen starke Aktivitäten erkennen, wohingegen Drüsenepithelzellen und MEZ keine Färbung aufweisen.

6. Succinodehydrogenase (SDH)

Im Epithel der Endstücke und Ausführungsgänge finden sich deutliche Anfärbungen, während MEZ, Gefäße und Nerven keine Enzymaktivität aufweisen. Die Enzymaktivität nimmt vom juvenilen Stadium an linear zu, erreicht in der Mitte der Laktation ein Maximum, um dann während der Involution steil auf den Anfangswert abzufallen. (Abb. 3 u. 4)

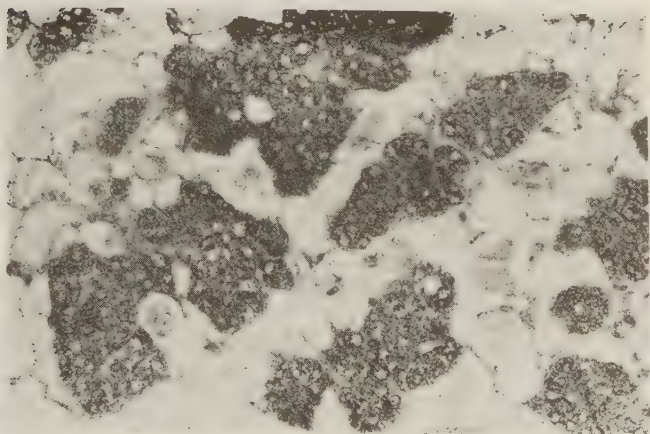


Abb. 3: Mamma einer graviden Ratte. Deutliche Succinodehydrogenase-Reaktion im Epithel der Endstücke und Ausführungsgänge. Verg. 90 x

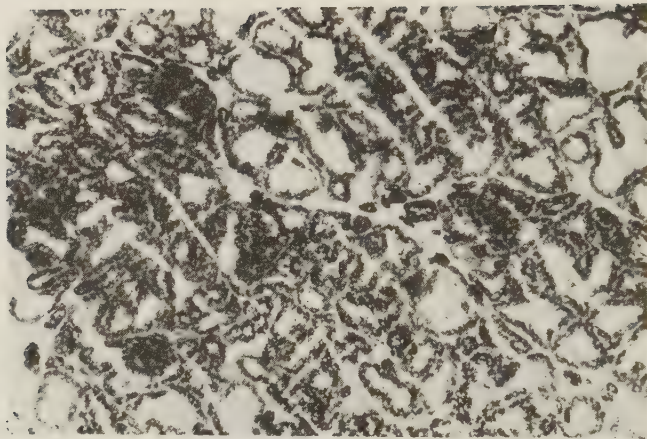


Abb. 4: Mamma im Laktationsstadium. Starke Succinodehydrogenase-Reaktion in den Epithelzellen der Drüsenalveolen. Vergr. 90 x

7. Monoaminodehydrogenase (MAO)

Während das Epithel der Alveolen und das Gangsystem sich deutlich anfärben und auch Nervenfasern und Gefäße Enzymaktivität zeigen, bleiben Fettzellen und Bindegewebe frei von Anfärbungen. Schon bei juvenilem Mammagewebe ist MAO nachzuweisen, ein erstes Maximum findet sich während der Gravidität, dann nochmaliger Anstieg in der Laktationsphase. Allmählicher Abfall in der Involutionszeit.

8. Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD)

Im Zytoplasma der Epithelzellen der Alveolen und Milchgänge, in quergestreifter Muskulatur und in den Lymphknotenkapseln - und - sinus findet sich Enzymaktivität. Auch die Media der Arterien ist angefärbt, nicht aber die Intima. Schnitte juveniler Mammæ zeigen deutliche Anfärbungen der Reaktionsprodukte, dann steigt die Enzymaktivität bis zur Laktationsphase beständig und stark an (Abb. 5). In der Involution fällt die Enzymaktivität stark ab und weist nur noch in erhaltenen Epithelkomplexen eine Restaktivität auf (Abb. 6).

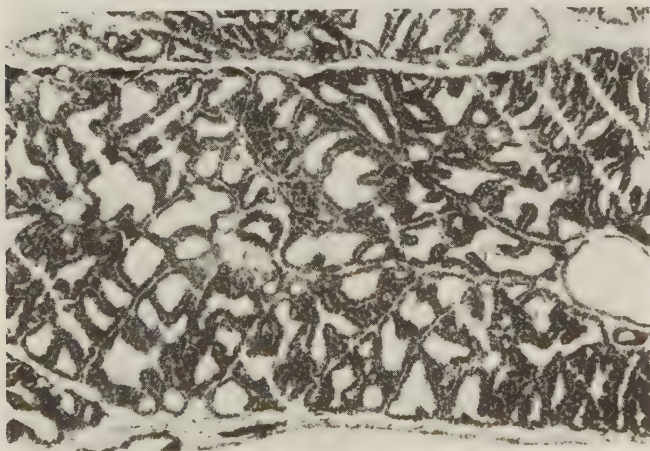


Abb. 5: Mamma während Laktation. Sehr starke G-6-PD-Reaktion im Zytoplasma der Epithelzellen der Drüsenalveolen. Vergr. 90 x

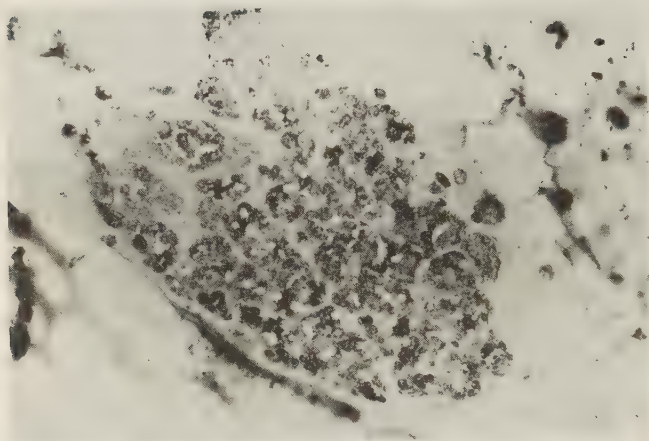


Abb. 6: Mamma in der Involutionsphase. Deutlicher Rückgang der Enzymaktivitäten der G-6-PD-Reaktion im Epithel. Erhaltene Aktivität in einzelnen Epithelkomplexen der zurückgebildeten Alveolen. Vergr. 90 x

9. Glutamat-Dehydrogenase (GDH)

Nur im Epithel der Alveolen konnte während der Laktation ein Maximum an Enzymaktivität festgestellt werden. In den Graviditäts- und Involutionsphasen sehr schwache Anfärbung der Reaktionsprodukte, bei juvenilen Gewebsschnitten Enzymnachweis negativ.

10. Malat-Dehydrogenase (MDH)

Die Epithelien der Drüsenalveolen sind angefärbt, die Kerne bleiben ausgespart. Auch Fettzellen zeigen eine deutliche Enzymaktivität im randlichen Zytoplasmaraum und in den Zellmembranen. Erkennbare Reaktionsprodukte

in der juvenilen Phase, erstes Maximum in der Gravidität, weiterer Anstieg in der Laktation und allmählicher Abfall in der Involutionszeit (Abb. 7 u. 8).

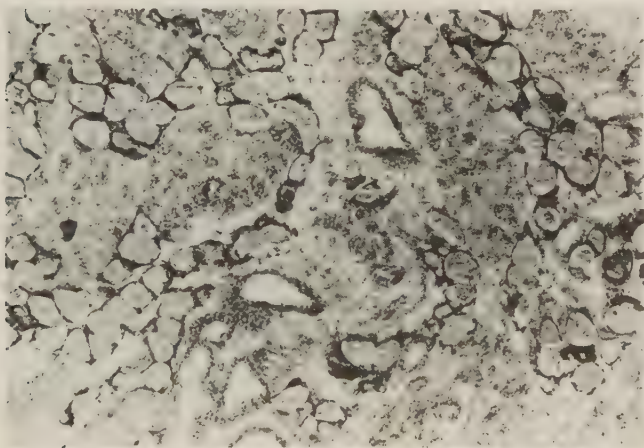


Abb. 7: Mamma während der Gravidität. Positive MDH-Reaktion in den Epithelien. Auch Fettzellen zeigen deutliche Enzymaktivität in den Zellmembranen und im marginalen Zytoplasmaraum. Vergr. 90 x

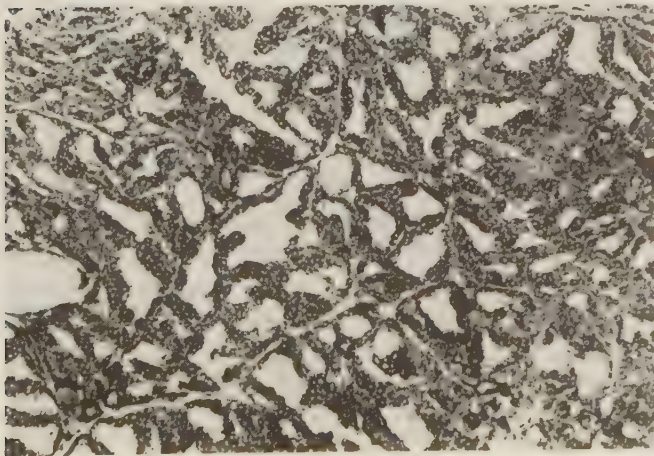


Abb. 8: Laktierende Mamma. Starke MDH-Reaktion in den Epithelien aller Drüsenalveolen nachweisbar. Vergr. 90 x

11. Glycerophosphat-Dehydrogenase (GLDH)

Im Epithel, interlobulärem Bindegewebe und Fettgewebe findet sich Enzymaktivität. Juvenile Gewebsschnitte zeigen deutliche Enzymanfärbungen. Es folgt ein linearer Anstieg der Enzymkonzentration bis zur Laktation, dann langsamer Abfall in der Involutionsphase.

12. Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (HBDH)

Im Epithel der Drüsenalveolen ist ein Farbniederschlag festzustellen, welcher sich auch in der Intima von Venen findet. Andere Gewebe weisen keine Enzymaktivitäten auf. Schon bei juvenilen Tieren ist die Enzymkonzentration auf knapp ein Drittel angestiegen, erstes Maximum in der Gravidität, nochmalige, aber nicht mehr so steile Erhöhung der Enzymaktivität während der Laktation, rapider Abfall auf das Anfangsniveau in der Involutionsphase.

13. Isozitronensäure-Dehydrogenase (IDH)

Hier konnte lediglich in den Drüsenepithelien Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die juvenilen Gewebsschnitte zeigten sehr schwache Anfärbungen der Reaktionsprodukte, doch steigt die IDH-Konzentration in der Gravidität rasch an, erreicht ihr Maximum während der Laktation und fällt langsam in der Involution wieder ab.

14. Laktat-Dehydrogenase (LDH)

Im Zellplasma der Drüsenepithelzellen, im interlobulären Binde- und Fettgewebe, in den Epithelien der Milchgänge und der Media von Arterien findet sich Enzymaktivität. Deutlich erkennbare Reaktionsprodukte charakterisieren juvenile Mammagewebe. Ein erstes Maximum in der Gravidität wird nur gering in der Laktation überschritten, langsamer Abfall in der Involution.

15. Leucin-Amino-Peptidase (LAP)

In sehr geringem Ausmaße konnte im Epithel der Drüsenalveolen während der Laktation LAP nachgewiesen werden. In den anderen Entwicklungsphasen waren die Reaktionsprodukte nur sehr geringgradig vorhanden.

16. Galaktosidase (GAL)

Die Reaktionsprodukte ergaben vor allem während der Laktationsphase positive Ausfälle. Es zeigten sich hier feingranulierte Niederschläge im Zytoplasma der Epithelzellen. Auch das Sekret wies teilweise positive Reaktion auf. In der Involutionsphase trat erwartungsgemäß eine Rückbildung der Reaktionsprodukte auf, wobei die Anfärbarkeit anfänglich stark und erst später erheblich abnahm. Die Uneinheitlichkeit dieses Nachweises erlaubte keine statistische Auswertung. (Abb. 9 u. 10)

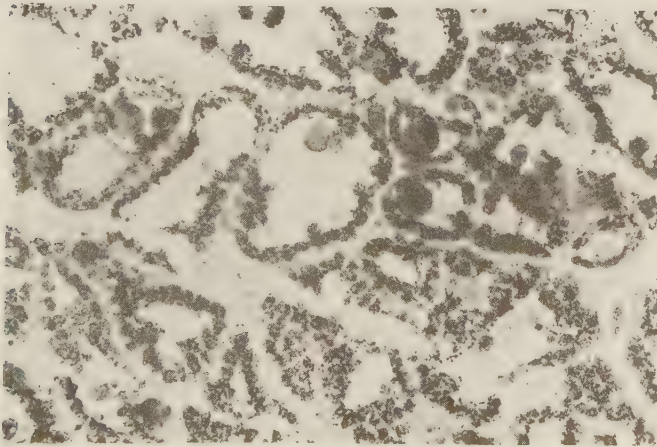


Abb. 9: Mamma im Laktationsstadium. Positive Reaktionsprodukte der Galaktosidase im Zytoplasma der Epithelzellen. Auch das Sekret weist positive Reaktion auf. In den Lumina große Fetttropfen. Vergr. 230 x

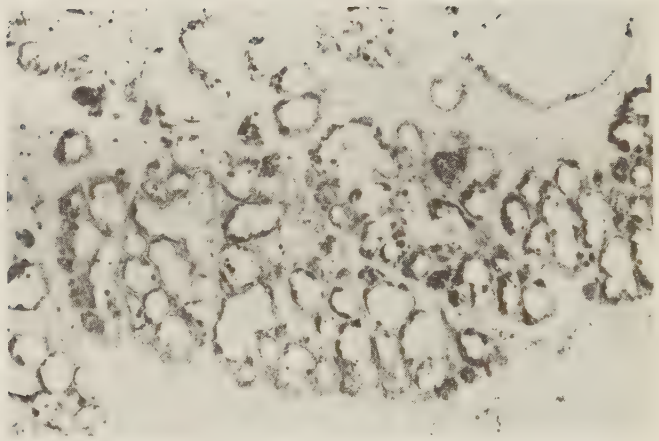


Abb. 10: Mamma in der Involution. Deutlicher Rückgang
der Galaktosidasekonzentration im Epithel.
Vergr. 90 x

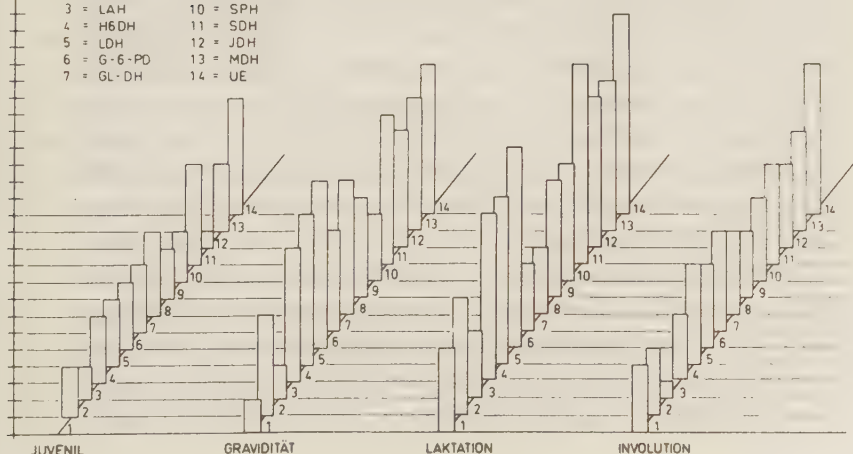
V Beurteilung der Ergebnisse

Bei der Auswertung des Untersuchungsgutes konnte folgende Feststellung gemacht werden: Die Enzymkonzentration war bei juvenilem Mammagewebe gemäß der noch nicht voll aktivierten Stoffwechselleistung entweder noch gar nicht oder aber sehr gering nachweisbar. In der Gravidität ändert sich diese Situation durch den Einfluß von Geschlechtshormonen, die zur Entwicklung des Drüsenparenchyms führen. Die hier untersuchten Enzyme zeigten einen deutlichen Aktivitätsanstieg, vereinzelt reichte er nahe an die Werte heran, die in der Laktation vorhanden waren. In der Laktationsphase, welche bei der Mamma die höchste Aktivitätslage darstellt, stiegen die Enzymwerte bis zu einem Maximum an. Hierbei ist festzustellen, daß die Steilheit des Anstiegs jedoch stark variiert. Dem Rückgang in der Funktionsphase der Involution ist ein Absinken der Enzymwerte entgegenzustellen. Die Befunde sind synoptisch in Abb. 11 dargestellt.

1 EA = 1 Enzymeinheit

EA

- | | |
|------------|-----------|
| 1 = GDH | 8 = G-6-P |
| 2 = MAO | 9 = APH |
| 3 = LAH | 10 = SPH |
| 4 = H6DH | 11 = SDH |
| 5 = LDH | 12 = JDH |
| 6 = G-6-PD | 13 = MDH |
| 7 = GL-DH | 14 = UE |



Phosphatasen

Es sind zwei Phosphatasen untersucht worden: Die alkalische mit einem ph-Optimum von 7-8 und die saure Phosphatase (ph-Optimum von 5). Diese Enzyme gehören den Hydro-lasen an, die organische Phosphorsäureester in ihre Komponenten spalten. Die APH ist ein typisches Osteoblasten-enzym, welches auch in der Niere und dem Dünndarm nachgewiesen werden konnte. Dieses Enzym konnte in der Basis der Epithelzellen und im MEZ der Mamma nachgewiesen werden. FOLLEY und FRENCH (1949) stellten fest, daß APH vielleicht eine Rolle bei der Milchsynthese spielt und zwar deshalb, weil APH Lactose-1-Phosphat hydrolysiert. Histotopochemische Studien der alkalischen Phosphatase wurden hauptsächlich von DEMPSEY, BUNTING und WISLOCK (1947), VERNE 1951 durchgeführt.

BÄSSLER und SCHÄFER und PAEK (1968) sowie BÄSSLER und BRETHFELD (1968) konnten elektronenmikroskopisch nachweisen, daß die APH in den basalen und interzellulären Zellmembranen lokalisiert ist. Die APH kann schon in den Mammaschnitten juveniler Tiere in der basalen Zellreihe der Drüsenschläuche festgestellt werden.

Die saure Phosphatase zeigt dieselbe Lokalisation wie die APH: Auch hier finden wir Epithelbasis und Myoe-pithelzellen angefärbt. Die Topohistochemie der Phosphatasen kann einen Hinweis darauf geben, daß phosphat-spaltende Eigenschaften in der basalen stoffwechselaktiven Zone der Epithelbasis eine Bedeutung für die Aufnahme und den Transport von Stoffen aus der Blutbahn haben (BÄSSLER und BRETHFELD 1968). R.E. MUNFORD (1963) hat Vergleiche angestellt zwischen den Aktivitäten der DNA, SPH und APH in Mammagewebe von Ratten und Mäusen. Er fand, daß während der Gravidität und der Laktation die Form der dargestellten Enzymaktivitätskurven ähnlich waren. Während der meisten Zeit der Gravidität und zu Beginn der Laktation zeigten die Kurven einen steilen, fast

gleichförmigen Anstieg. Die Frühgravidität zeigte einen geringen Anstieg, während das Maß des Anstieges im letzten Laktationsabschnitt gering war oder sogar negativ wurde.

Die Enzyme des Zitronensäure-Zyklus

Drei der untersuchten Enzyme greifen direkt im Zitronensäurezyklus an. Es sind dies: SDH, MDH, IDH. Das Enzym mit der geringsten Enzymaktivität in der juvenilen Phase der Mamma, bei der nur wenige Drüsenschläuche zu erkennen sind, ist die IDH. Wie auch die MDH kann die IDH in dem Epithel der Drüsenschläuche und in Mitochondrien des Zytoplasmas der Zellen nachgewiesen werden. Auch die SDH zeigt diese Lokalisation.

In der Gravidität und Laktation zeichnet sich die Mamma durch die Sprossung der Gänge, die Entwicklung der Drüsenläppchen und Alveolen aus. Die verstärkte Bildung von Ribosomen, des Ergastoplasma, und der Mitochondrien ist im Elektronenmikroskop nachweisbar. Alle drei Enzyme des Zitronensäurezyklus weisen in der Gravidität einen deutlichen Enzymaktivitätsanstieg auf, der in der Laktation noch zunimmt und hier bei der SDH die höchsten Werte erreicht. In der Involutionsphase finden wir einen raschen Abfall der Enzymaktivität bei allen drei der hier untersuchten Enzyme.

Enzyme des Kohlenhydrat-Abbaus

Glukose-6-Phosphatase spaltet die Phosphatgruppe des Glukose-6-Phosphats ab. Dadurch wird Glukose in der Zelle freigesetzt. GOMORI (1952) hat dies histotopochemisch dargestellt. Man erkennt G-6-P histologisch an dem schwarz-braunen bandförmigen Saum an der Basis der Epithelzellen, sehr deutlich sind die Myoepithelzellen angefärbt.

Aus Glukose entsteht nach Durchlaufen einiger Abbaustufen unter anderem DOPA, das mit Hilfe von GLDH zu Glycerin-1-Phosphat dehydriert wird (Rapoport, 1969). Dies ist ein Ausgangsstoff zur Fettsynthese. Glukose ist nach FOLLEY und Mc NAUGHT (1961) die primäre Quelle für die Bildung von Fettsäuren.

ABRAHAM und CHAIKOFF (1959) haben den Stoffwechsel von G-6-P der Ratte genauer untersucht und herausgefunden, daß etwa die Hälfte der Glukose-Kohlenstoffatome, welche in Acethyl-CoA enthalten sind, den Pentosephosphat-Zyklus durchlaufen. McLEAN (1960, 1964) konnte jedoch nachweisen, daß die Begrenzung des Pentosephosphat-Zyklus nicht durch die Enzyme dieses Zyklus bewirkt wird, sondern durch den Grad der Reoxidation von NADPH_2 , welches seinerseits wiederum von der Intensität der Fettsäuresynthese abhängt. Die Fettsäuresynthese in der Mamma der Ratte wird nach HOWANITZ und LEVY (1965) durch Acethyl-CoA-Carboxylase begrenzt. So bewirkt der rasche Abfall der Acethyl-CoA-Carboxylase-Aktivität in der Involutionphase nicht nur einen Rückgang der Fettsäuresynthese, sondern auch einen Abfall der Aktivität des Pentosephosphat-Zyklus.

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Das Schrittmacherenzym des Pentosewegs - Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase - auch Zwischenferment Warburgs genannt (Rapoport 1969), greift Glukose-6-Phosphat zu Anfang seiner Umsetzung an und bildet in Anwesenheit von TPN (Triphosphopyridinnucleotid) 6-P-Gluconolakton, welches am Anfang des Pentosephosphat-Zyklus steht. Von großer Wichtigkeit ist auch die Tatsache, daß durch die Dehydrierung von G-6-P NADPH_2 frei wird, welches für die Fettsäuresynthese notwendig ist.

E.A. JONES (1967) hat folgende Änderung der Enzymaktivität nach Absetzen der Jungen von Ratten festgestellt:

nach 12 Stunden noch 56 %

nach 24 Stunden noch 16 %

Enzymaktivität von G-6-PDH nachweisbar.

GLOCK und McLEAN (1954) haben nachgewiesen, daß laktierende Mamma die größte Menge von G-6-PDH enthält, verglichen mit anderen Mammageweben. KUHN (1968) hat gezeigt, daß es eine Parallele zwischen dem Anstieg von G-6-PDH und Gewebslaktose gibt. Dies gilt aber nur nach der Geburt, da Laktose von KUHN vor der Geburt nicht entdeckt werden konnte. Ein Seitenweg des Kohlenhydratabbaus führt über das Pyruvat zum Laktat. Diese Reaktion ist anaerob und verläuft mittels LDH, Coenzym ist dabei NADH_2 . Laktat stellt das Endprodukt des anaeroben Abbaus dar (Rapoport, 1969). Laktat wird in der Leber abgebaut, wobei ATP frei wird. Die LDH der Leber reagiert nicht nur mit NAD sondern auch mit NADP als Coenzym, welches für die Fettsynthese von Bedeutung ist.

Ein peptidspaltendes Enzym stellt die LAP dar, welche in der Leber gebildet wird und besonders in der Niere eine hohe Enzymaktivität aufweist. Bei der Mamma ist das Enzym sehr schwach im Drüsenepithel nachzuweisen. Die LAP spaltet schrittweise vom N-terminalen Ende der Polypeptide her Peptide ab.

Die Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase spielt beim Acetoacetat- β -Hydroxybutyrat-System eine Rolle. β -HbDH ist ein sessiles Mitochondrienenzym. Es ist an der Bildung von Acetonkörpern beteiligt. Das Enzym ist im Epithel der Drüsenalveolen festzustellen.

Monoamino-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase

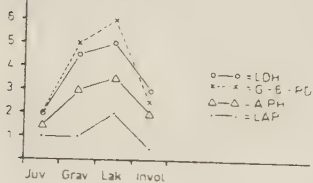
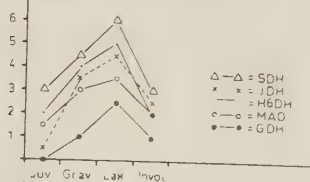
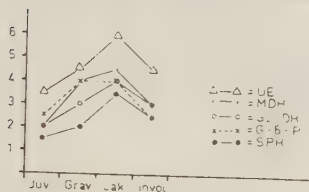
Aminooxydasen inaktivieren die biogenen Amine. Sie zählen zu den Flavoproteinen, die Amine zu Iminen dehydrieren. Nach der Substratspezifität unterscheidet man Mono- und Di-Amino-Oxydasen. Die MAO braucht eine basische Gruppe im Substrat.

Der Abbau von biogenen Aminen mittels MAO läuft über die Glutaminsäure, welche durch die GDH zu Ketoglutarat, einem Baustein des Citratzyklus, dehydriert wird. Glutamyl-Dehydrogenase besteht aus etwa 40 Proteinuntereinheiten. Bei der Umwandlung von L-Glutamat in 2-Ketoglutarat handelt es sich um eine oxydative Desaminierung. Durch diese Reaktion wird eine wichtige Verbindung zwischen dem Aminosäurestoffwechsel und dem Citratzyklus hergestellt. MUNFORD (1964) hat festgestellt, daß die GDH-Enzymaktivität während der späten Gravidität ein erstes Maximum erreicht, welches nach der Geburt abrupt abfällt, ein zweites Maximum in der späten Laktation aufweist, um nach Laktationsende rasch abzufallen.

Die unspezifische Esterase gehört in die Gruppe der Hydrolasen, welche unter Wasseraufnahme freie Fettsäuren von Triglyzeriden trennt. Unspezifische Esterasen bauen als Lipasen Fettgewebe ab. Dies zeigt sich deutlich, wenn man die Stadien Gravidität und Laktation der Mamma histologisch beurteilt. In der Gravidität sieht man, daß die Enzymaktivität der unspezifischen Esterasen in der Peripherie der Drüsenläppchen sehr hoch ist, was daraufhinweist, daß das Fettgewebe mehr und mehr dem Parenchym weichen muß und so also durch unspezifische Esterasen abgebaut wird.

Die Intensitätsunterschiede der einzelnen histochemisch geführten Enzymnachweise sind in Abb. 13 zusammengestellt und zeigen einen Anstieg mit zunehmender Hormonwirkung auf das Drüsenepithel in Gravidität und Laktation an. Während der Involution fallen die Aktivitätskurven eindeutig, wenn auch mit Phasenverschiebung ab.

ERGEBNISSE ENZYM/HISTOCHEMISCHER UNTERSUCHUNGEN AN DER MAMMA



VI Zusammenfassung

1. Bei den an 25 Ratten durchgeführten Untersuchungen während der Entwicklungsphasen juveniler, gravider, laktierender und in Rückbildung befindlicher Brustdrüsen konnte mit erweitertem Enzymmuster sowohl die Lokalisation der Reaktionsprodukte und somit der Enzyme selbst als auch deren jeweilige Enzymaktivität festgestellt werden. Hierbei zeigte sich, daß die größte Enzymaktivität in die aktivste physiologische Funktionsphase, die Laktation, fällt.
2. Eine Ausnahme bildet die Glukose-6-Phosphatase, welche schon während der Gravidität die höchste Enzymaktivität erreicht.
3. Besonders hohe Enzymkonzentrationen während der Schwangerschaft konnte bei der unspezifischen Esterase, der Succino-Dehydrogenase und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase festgestellt werden.
4. Dagegen ist die Enzymaktivität der sauren Phosphatase, der Glutamat-Dehydrogenase und der Leuzin-Dehydrogenase im Vergleich mit den anderen Enzymkonzentrationen deutlich geringer.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, S.,
F. Hirsch and
I.L. Chaikoff
The quantitative significance of glycolysis and non-glycolysis in glucose utilization by rat mammary gland.
J. biol. Chem. 211, 31-38 (1954)
- Abraham, S. and
I.L. Chaikoff
Glycolytic pathways and lipogenesis in mammary glands of lactating and nonlactating normal rats.
J. biol. Chem. 234, 2246-2253 (1959)
- Bässler, R.,
A. Schäfer und
S. Paek
Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen zur Morphologie und Funktion myoepithelialer Zellen.
Verh. dtsh. Ges. Path. 51, 301-307 (1967)
- Bässler, R. und
V. Brethfeld
Enzymhistochemische Studien an der Milchdrüse. Histochemie 15, 270-286 (1968)
- Deimling, O.H. v.
Die Darstellung phosphatfreisetzen-der Enzyme mittels Schwermetall-Simultan-Methoden.
Histochemie 4, 48-55 (1964)
- Dempsey, E.A., H.
Bunting and G.B.
Wislocki
Observations on the chemical cytology of the mammary gland.
Amer. J. Anat. 81, 309-341 (1947)
- Folley, S.J. and
T.H. French
The intermediary metabolism of the mammary gland.
Biochem. J. 45, 270-275
- Folley, S.J. and
M.L. McNaught
Biosynthesis of milkfat. In: Milk, The mammary gland and its secretion, ed. by S.K. Kon and A.T. Cowie, vol. 1, p. 441-479. New York and London: Academic Press 1961
- Glenner, G.G.,
H.J. Burtner and
G.W. Brown
The histochemical demonstration monoaminooxidase activity by tetrazolium salts.
J. Cytochem. 5, 591-600 (1957)
- Glock, G.E. and
P. McLean
Further studies on the properties and assays of glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phospho-gluconate-dehydrogenase of rat liver.
Biochem. J. 55, 400-408 (1954)
- Gomori, G.
The histochemistry of esterases.
Intern. Rev. Cytol. 1, 323-335 (1952)

- Gössner, W. Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* 1, 48-96 (1959)
- Howanitz, P.J. and H.R. Levy Acetyl-CoA carboxylase and citrate cleavage enzyme in the rat mammary gland. *Biochem. biophys. Acta* 106, 430-433 (1965)
- Jones, E.A. Changes in the enzyme pattern of the mammary gland of the lactating rat after hypophysectomy and weaning. *Biochem. J.* 103, 420-427 (1967)
- Kuhn, N.J. Lactogenesis in the rat. *Biochem. J.* 106, 743-748 (1968)
- McLean, P. Carbohydrate metabolism of mammary tissue. III. Factors in the regulation of pathways of glucose catabolism in the mammary gland of the rat. *Biochem. Biophys. Acta* 37, 296-309 (1960)
- McLean, P. Interrelationship of carbohydrate and fat metabolism in the involuting mammary gland. *Biochem. J.* 90, 271-278 (1964)
- Munford, R.E. Changes in the mammary glands of rats and mice during pregnancy, lactation and involution. *J. Endocrin* 28, 17-34 (1963)
- Munford, R.E. A review of anatomical and biochemical changes in the mammary gland with particular reference to quantitative methods of assessing mammary development. *Dairy Sci. Abstr.* 26, 293-304 (1964)
- Nachlas, M.M., Tsou, K.C., de Souza, E. Cheng, C.S. and Seligman, A.M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of the new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* 5, 420-436 (1957)
- Pearse, A.G.E. Histochemistry, theoretical and applied. London: Churchill Ltd. 1961
- Rapoport, S.M. Medizinische Biochemie. Berlin 1969

Rudolph und
Klein

Histochemische Darstellung und
Verteilung der G-6-PD in norma-
len Rattenorganen.

Histochemie 4, 29-38 (1958)

Verne, J.

Etat actuel de la cytochimie de
la grande mammaire. Cell. int. Cent.
nat. Rech. sci. 32, 59 -66 (1961)

Zimmermann, H.

Histochemischer Fermentnachweis.
Ihre Bedeutung in der Pathologie.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 1959,
374-391

LEBENS LAUF

Als zweites Kind meiner Eltern, Dr. med. habil. Wilhelm Leun und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Schultheis, wurde ich am 15.12.1940 in Gießen geboren. Wegen eines Beinleidens konnte ich erst 1948 in die Grundschule in Gießen eingeschult werden. Im Jahre 1952 kam ich auf eine Internatsschule in Wertheim am Main, die ich 2 Jahre besuchte. Nach mehreren Schulwechseln legte ich 1963 an der Christian-Wirth-Schule in Usingen die Reifeprüfung ab. Im selben Jahr begann ich mit dem Medizinstudium an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz, wo ich 1973 das Medizinische Staatsexamen ablegte. Danach arbeitete ich ein Jahr als Medizinalassistent in Cochem. Zur Zeit befinde ich mich in Ausbildung zum Facharzt für Orthopädie im Kreiskrankenhaus in Trostberg/Traunstein.

Anschrift:

Ass.-Arzt J. Leun

63 Gießen

Freiligrathstr. 11

Druck: Print KG München T. 34 2149